

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平4-501501

⑬ 公表 平成4年(1992)3月19日

⑭ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 12 N 15/72
1/21
15/74

ZNA

7236-4B
※

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

(全16頁)

⑯ 発明の名称 95KB程度の大きさのDNA断片用P1バクテリオファージクローニング系

⑰ 特 願 平1-504972

⑱ 翻訳文提出日 平2(1990)10月15日

⑲ 出 願 平1(1989)1月30日

⑳ 国際出願 PCT/US89/00368

㉑ 国際公開番号 WO89/09826

㉒ 国際公開日 平1(1989)10月19日

優先権主張 ㉓ 1988年4月15日 ㉔ 米国(US) ㉕ 182,112

⑳ 発 明 者 スターンバーグ、ナット・レオン アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19382、ウエストチエスター、ドーセットドライブ1116

㉑ 出 願 人 イー・アイ・デュボン・ドウ・ アメリカ合衆国デラウェア州 19898、ウィルミントン、マーケットヌムール・アンド・カンパニー トストリート1007

㉒ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 以下の配列:

P1 loxP部位-アンピシリン耐性遺伝子-pBR322 ori-pac-P1 loxP部位-ポリリンカークローニング部位-カナマイシン耐性遺伝子-P1プラスミドレプリコンを包含するDNA断片をクローニングするためのベクターであって、上記配列が、P1プラスミドレプリコンが最初のP1 loxP部位と結合してその配列が反時計回り方向に読まれるように開状化されたベクター。

2. 上記ベクターがポリリンカークローニング部位とカナマイシン耐性遺伝子との間に挿入されたlacZプロモーターの制御下でP1複製レプリコンを有する請求項1記載のベクター。

3. P1ra⁺cm⁻2cl.100 9.16及びP1ra⁺cm⁻2cl.100 10.1より成る群から選択される4倍体ファージ変異体で増殖された細菌株。

4. NS2961及びNS2962と呼ばれる請求項3記載の細菌株。

5. BS591及びNS2974と呼ばれるCre⁺グラム陰性細菌株。

6. 95kbの大きさのDNA断片の増殖をクローニングし、制御する方法であって:

(a) 外生DNA断片を請求項2のベクターのポリリンカークローニング部位に挿入し;

(b) 工程(a)の生成物をpac⁻開裂プロフィシエント抽出物及び順-尾プロフィシエント抽出物と接触させ;

(c) lacIqリプレッサーを有するCre⁺グラム陰性細菌株を工程(b)の生成物で感染させ;

(d) 工程(c)の生成物にIPTGを加えることによってlacIqリプレッサーを抑制解除し;

(e) クローニング及び増殖化ベクターDNAを回収する;

工程から成る方法。

7. Cre⁺グラム陰性細菌株がNS2974と呼ばれる細菌株である請求項6記載の方法。

8. 上記pac⁻開裂プロフィシエント抽出物がNS2962と呼ばれる増殖性細菌株から調製される請求項6記載の方法。

9. 上記順-尾プロフィシエント抽出物がNS2961と呼ばれる増殖性細菌株から調製される請求項6記載の方法。

10. そこに挿入された外生DNA断片を有する請求項1又は2記載のベクターのDNAのin vitro P1バクテリオファージパッケージングのための工程であって、断片含有ベクターのDNAをpac⁻開裂プロフィシエント抽出物及び順-尾プロフィシエント抽出物と接触させることを包含し、この場合上記断片の大きさが95kb又はそれ以下である工程。

発明の名称

95KB程度の大きさのDNA断片用P1バ
クテリオファージクローニング系

発明の分野

この発明は大きさが95KB程度のDNA断片の増殖を制御するバクテリオファージP1クローニング系に関する。

発明の背景

組換えDNA技術は高等真核生物(植物と動物)の染色体からのDNA断片を*Escherichia coli* (E. coli)のような細菌の中で増殖することができるベクターを使用してクローン化し、増殖することを可能にした。

DNAをその取込みを可能にした細菌中に直接導入する場合、DNAの細胞への取込みの効率DNAの大きさが20KB以上に増加すると劇的に減少するのでDNAは比較的小さく(20KB以下)なければならない。このため、大きなDNAを細菌に導入するため別の供給経路が探索された。ウィルス粒子中にバクテリオファージベクターDNAを包み込む技術がこの必要に応ずるため開発された。それは包み込んだDNAをほとんど単位効率を伴う感染により細胞に供給される利点を持つ。Bruning等、Gene(1978年)75巻、85~107ページとCollins等、Proc. Natl. Acad. Sci. (1978年)75巻、4242~4246ページはSternberg等、Gene(1975年)1巻、255~280ページが開発したラムダバク

11. 上記pac-調製プロフィシエント抽出物がNS2962と呼ばれる陽性細菌株から調製される請求項10記載の工程。

12. 上記順-尾プロフィシエント抽出物がNS2961と呼ばれる陽性細菌株から調製される請求項10記載の工程。

13. 95kbの大きさのDNA断片のクローニング方法であって:

(a) 外生DNA断片を請求項1のベクターのポリリンカークローニング部位に挿入し;

(b) 工程(a)の生成物をpac-調製プロフィシエント抽出物及び順-尾プロフィシエント抽出物と接触させ;

(c) Cre⁺グラム陰性細菌株を工程(b)の生成物と感染させ;そして

(d) クローン化ベクターDNAを回収する;

工程から成る方法。

14. Cre⁺陽性株がB5591と呼ばれる細菌株である請求項13記載の方法。

テリオファージのインビトロパッケージ反応を利用してプラスミドとラムダバクテリオファージcos部位の融合物であるコスミドベクター中でクローン化した大型挿入断片を包み込んだ。cos部位はラムダバクテリオファージ頭部へのDNAパッケージの開始に必要な認識要素を提供する。

インビトロパッケージ反応におけるラムダバクテリオファージの主要な欠点はラムダバクテリオファージ頭部は49.5kbより大きいDNAを収容できないということである。従って、cosベクター自身が約2kbの大きさであることを考慮に入ると、47kb以上のクローン化可能なDNAをベクターに挿入し、ラムダバクテリオファージ頭部に包み込むことはできない(Murray, Lambda II 236 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1986年)、395~432ページ)。

従って、50kbより大きい遺伝子のクローニングは達成することができず、及び大きさが数メガ塩基のDNAの染色体部分の「ウォーキング」又は「ジャンピング」による地図作成は困難であり、このことはラムダバクテリオファージ系の制限となっている。研究者はより大きいDNA断片をクローニングする有効な手段として二つの系、すなわちラムダバクテリオファージより大きい頭部を持つファージ系と酵母クローニングベクターを探究した。

Rao等、J. Mol. Biol. (1985年) 185巻、565~578ページはT4 DNA(約185キロ塩基)をインビトロでT4バクテリ

オフィージ頭部を包み込むことができることを示した。この反応の効率は低加したT4 DNAマイクログラム当り10⁴~10⁵プラーク形成単位(PFU)であった。しかしながら、Black, Gene (1986年) 46巻、97~101ページは様々なベクターDNAをT4頭部に包み込み、適当な細菌に注入後増殖DNAを回収する努力を重ねたが、追加DNAのマイクログラム当り10⁴~10⁵PFUを上回る効率は得られなかった。Blackの結果は哺乳動物細胞のそのような複雑なゲノムの150kb挿入断片の完全なライブラリー(すなわち、150kb挿入断片の約20,000個相当)を生成させることはT4パッケージ系の使用を以てしては極めて困難であることを示唆する。第二の恐らくより困難な問題は、大きなDNA断片をクローン化し増殖するためT4パッケージ能力を利用できるクローニング用ベクターが存在しないことである。実際、T4パッケージの開始に必要なT4配列に関してはほとんど何も知られていないので、そのようなベクターを編み立てることは困難であろう。

Burke等、Science (1987年) 236巻、808~812ページは哺乳動物DNAの大セグメントをミニ染色体として酵母中でクローニングすることができた。挿入するDNAは酵母複製要素、酵母分裂要素又はセントロメア、及び酵母テロメアを含むベクター中にクローン化し、生成するキメラDNAを直接DNA形質転換により酵母に導入する。100kbより大きいDNAの挿入断片を持つミニ染色体を確認した。この系には二つの問題がある。第一にDNAの挿入断片を

持つ酵母クローンの生成は極めて非効率であり、記述した実験においては約300クローンが挿入DNAのマイクログラム当たり生成した。第二に一旦DNAの挿入断片を持つクローンを得られると、挿入DNAを振り当てて回収することは困難である。形質転換した酵母細胞において、ミニ染色体は細胞の全DNAの1:1000以下に相当し、従ってDNAハイブリダイゼーション法によってのみ検出することができる。その上、各々の形質転換した細胞内で挿入断片は増幅することができず、それらは細胞中へのプラスミド複製によってのみ一部分を回収することができる。

他の関連の系はGaitanaris等、Gene (1985年) 46巻、1~11ページに記述されている。DNAを注入することができ、次いでそれを細胞内に注入することができるラムダベクターが記述されている。注入したDNAは宿主染色体中に細胞当たり1コピー、又は染色体外に細胞当たり多数コピー組み込まれて細胞内に維持される。このベクターは30kb以下のDNAを収めることができるが、組み込まれたプロファージのDNA量はその挿入断片が組み込まれたプロファージにおけるそれと重複する第二の感染ラムダキメラと相同重複することにより著しく増加することができる。この方法で任意のプロファージにおける複製するDNAのセグメントを100kb以上に増加し、その後ベクターの染色体外状態を調育することにより増幅することができる。しかしながら、これを達成するには少なくと

も数回の複製し重複するDNAのより小さいセグメントをクローン化し、それらを重複大により共に配列する困難な方法を実行することが必要である。その上、大きなDNA挿入断片は一旦組み立てられると回収することが困難であり、何となればそれはラムダウイルス粒子中に包み込むには大きすぎるからである。染色体外状態にあるDNAの複製率もそれが大きいことから困難である可能性がある。

発明の要約

この発明は次の配列、すなわちP1 loxP部位-アンピシリン耐性遺伝子-pBR 322 ori-pac-P1 loxP部位-ポリリンカー-クロニング部位-カナマイシン耐性遺伝子-P1プラスミドレプリコンからなる95kb程度の大きさのDNA断片のクロニング用ベクターに関し、前記配列はP1プラスミドレプリコンが第一のP1 loxP部位に付着して配列が反時計方向に読まれるように異化している。このベクターの好ましい具体化は上に列挙したすべての要素並びにポリリンカー-クロニング部位とカナマイシン耐性遺伝子の間に挿入されたlacZプロモーターの制御下にあるP1着目レプリコンを持つ。

95kb程度の大きさのDNA断片のクロニング及び増幅を制御する方法は(a) 外因性DNAをP1着目レプリコンを含むベクターのポリリンカー-クロニング部位に挿入し、(b) 段階(a)の生成物をpac-開裂プロフィシエント抽出物及び第一着目プロフィシエント抽出物と接触させ、(c)

Cre⁺、lacIqレプレッサーを持つグラム陰性菌を段階(b)の生成物に感染させ、段階(c)の生成物にIPTGを添加してレプレッサーを脱抑制し、及び(e) クローン化し増幅したDNAを回収する段階からなる。

この発明は菌株NS2962とNS2961及び菌株から調製したpac-開裂プロフィシエント及び第一着目プロフィシエント抽出物からなるインビトロP1パッケージ系に関する。包み込んだDNAはその後E. coliのような種々のグラム陰性細胞に感染させるために使用することができる。

BS591及びNS2974と称するCre⁺グラム陰性菌菌株を特別に工学処理してこの発明のベクターにより感染し形質転換した。BS591はlacIqレプレッサー遺伝子を持たない。一方NS2974はlacIqレプレッサー遺伝子を持ち、従って一旦形質転換するとIPTGを添加するまでlacZプロモーターを抑制することができる。

図面の簡単な説明

第1図は一般的なP1バクテリオファージクローニングと増幅系を示す。

第2図は本発明に関連するP1遺伝子と要素の地図を示す。

第3図は、本発明のベクターの組立てを示す。

第4A図はガンマ⁺P-dATPで同様に付属した800bpゲル-3 pac断片を示す。

第4B図はpcp⁺パッケージ抽出物のpac開裂活性を示す。

第5A図はCreリコンビナーゼが作用した場合のpNS358のDNAの分離を示す。

第5B図は形質転換したBS591菌においてCreが作用したベクターDNAを示す。

第6A図はpNS364の構造を示す。

第6B図はkan-R遺伝子、P1プラスミドレプリコン、及びP1着目レプリコンを含むプラスミドpNS364の増幅を示す。

第7A-7C図と第8A-8B図は包み込んだpNS358DNAとそれを含むE. coli挿入断片の回収と増幅を示す。

寄託の声明

本発明に関する次の地図とプラスミドはブダペスト條約により、Maryland 20852-1776, Rockville, Parkway Drive 12301に存在するAmerican Type Culture Collectionに寄託した。

pNS20はATCC Accession No. 87666と命名された。

pNS42はATCC Accession No. 87667と命名された。

BS591はATCC Accession No. 53760と命名された。

NS2961はATCC Accession No. 87665と命名された。

NS2962はATCC Accession No. 87664と命名された。

NS2974はATCC Accession No. 53759と命名された。

発明の詳細な説明

本発明はバクテリオファージP1のインビトロパッケージ系と95kb程度の大きさの外因性DNA挿入断片の導入と増幅制御のための新規なクロニング用ベクターに関する。

る。このクローニング系の確立に使用される多くの要素は最近詳細に記述されている (Yarnolinsky 他 Sternberg, The Bacteriophage, Bacteriophage P1, Chapter 9, 1988, Plenum Publishing Corporation, 233 Spring St., New York, NY)。P1遺伝子とloxP-Cre組換え系、P1プラスミドレプリコン、P1増殖レプリコン、及びpac部位を第2図に示す。

ここに記述するクローニング系はラムダコスミドクローニング系で得ることができるDNA断片の大きさの少なくとも2倍の大きさのその単離を可能にする。この大きさの増加は次の有用性を持つ。すなわち

(1) 45-95kbの範囲の遺伝子は直接クローニングでき、及び25-45kbの大きさの範囲の遺伝子はより容易にクローニング化できる。

(2) 染色体「ウォーキング」及び「ジャンピング」技術は少なくとも2倍に速度を上げることができ、共に連続することを要する相連するセグメントの数が減るのでより正確になるであろう。

(3) P1ファージは広範囲の種類のグラム陰性細菌(第1図)にそれらのDNAを注入することができるように見えるので、インビトロP1パッケージ系は他の方法では困難からDNAをよく採取しない細菌にDNAを効率的に供給する手段として有用であろう。

loxP-Cre組換え系

これは組換えが極めて効率的に起こる34bp部位又は

DNA配列 (loxP) と、前記部位に接触し組換えを促進するタンパク質酵素(Cre) とからなる部位特異的組換え系である。Abramski等、Cell(1983年)32巻、1301-1311ページは超コイル、切れ目の入った環状、又は線状DNAとloxP部位との間の組換えはCreの存在下で起こることを示した。P1生活環においてCreは100kb離れたloxP部位との間の組換えを促進することができる。Cre遺伝子はラムダベクター中にクローニングされ、E. coli染色体中にラムダ-P1:Creプロファージとして存在する場合Creを発現する。Sternberg等、J. Mol. Biol.(1986年)187巻、197-212ページはプロファージがそれから組み立てられる接合的Cre遺伝子を含むpHR103変異株を記述している。

P1プラスミドレプリコン

P1プラスミドレプリコンと分配領域は細菌性細胞の集団における単位コピー染色体外要素としてのP1プロファージを維持するための責任がある。それはDNAの開始点配列で細胞分裂開始前1図の複製を開始する作用をするタンパク質をコード化する複製遺伝子(repP)を含む。レプリコンには二つの遺伝子parAとparPも存在し、それらはparS部位で細胞分裂の際、複製の生成物を細胞間に正確に分配する作用をする。

P1増殖レプリコン

P1増殖型及び増殖レプリコンはプロファージ脱抑制後30分以内に高いコピー数までDNAを複製することができ

る。このレプリコンは転写プロセサターP53と下流のrepL遺伝子からなり、その生成物は開始点配列で複製を促進する作用をする。レプリコンはP53に結合するファージolレプレッサーにより負の制御を受け、repL遺伝子の転写を妨げる。

プロセサターレプレッサーパッケージ、pac、及びpac認識タンパク質 (PRP)

ウイルス生活環の間のパッケージ反応に使用するDNA基質は環状-尾端形式で配列するP1染色体の個々の単位からなるコンカチマーである。パッケージは4段階の過程である。すなわち(1)第1段階では特異的部位、pacが認識されてPRPタンパク質(一つ又は複数)により切断され、(2)分断の一方の側のDNAは空のファージ頭部に頭部が完全に充満するまで包み込まれ、(3)第2の分断(頭部の切断)が起って包み込まれたDNAがコンカチマーの環から分離され、及び(4)第3の頭部の切断で生成した自由末端から2図目のDNAパッケージが始まり、従って尾端、プロセサター頭部切断が生れる。Sternberg等、J. Mol. Biol.(1987年)194巻、469-479ページは十分に機能的なpac部位を含む101bpの配列のクローニングを記述している。又、これらの研究はpacの認識と切断はファージの頭部と尾部の不共存下で起こることができ、P1遺伝子9(第2図)の変異により機能が失われることを示している。包み込まれたP1 DNAの末端は包み込まれたラムダDNAのように相補的な一本鎖配列を含まず、従ってP1DNA

を細菌に注入した後、その複製は鎖のアニールングによって起こらず、むしろ分子の末端に存在する相同配列の間の組換えによって起こる。このような状況であることから、P1パッケージを使用する任意のベクター、又は任意の頭部パッケージを使用するそれは線状の包み込まれたDNAを組換えにより環化する手段を工夫しなければならない。この発明において、環化はベクターにP1loxP部位を組み込み、Creリコンビナーゼを使用してCre⁺、グラム陰性細菌に注入後DNAを環化する。

P1は二つの大きさの頭部を生成し、大きい頭部は105-110kbのDNAを収めることができ、小さい頭部は40kb以下のDNAを収めることができる。正常にはP1野性型感染における大頭の小頭に対する比率は10:1であるが、しかしながら、ここで使用する本発明の包み込んだリゼートの調製に使用するP1のco-2変異株は頭部大きさの比率が1:1である。もっぱら大きいファージ頭部のみにDNAの包み込みを確実にするため、DNAは小頭部に収めることができるより小さくなければならない。

P1宿主範囲

バクテリオファージP1は別な方法ではDNAを有効に採取することができない様々なグラム陰性細菌に侵襲し、及びそのDNAを注入することができる。P1ビリオンが侵襲しDNAを注入することができる細菌株の数を第1図に示す。

表 1 変
PIの宿主範囲

菌 種	PI DNA注入	PIファージ生産
<i>Escherichia coli</i> K12, C.B	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	(-)+	+
<i>Salmonella typhi</i> & <i>abony</i>	+	+
<i>Klebsiella aerogenes</i>	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	(-)+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+
<i>Enterobacter liquefaciens</i> & <i>cloncae</i>	+	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+	+
<i>Erwinia amylovora</i>	+	+
<i>Yersinia pestis</i> & <i>pseudotuberculosis</i>	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(-)+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(-)+
<i>Flavobacterium</i> sp. N 64	+	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	-
<i>Acetobacter suboxydans</i>	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	-
<i>Myxococcus xanthus</i>	+	-

Yanish-Parron等によりGene(1985年)33巻、102~119ページに記述されている。MS2974はJM 109であり、機能 Cre 遺伝子とlacIqレプレッサーを含むラムダ-*imm434*-PIプロファージを持つ。、594とW 3350株はCambell等、Carnegie Institute of Wash. Yearbook(1987年)57巻、386ページに記述されており、YMCはDennert等、J. Mol. Biol.(1968年)33巻、322~329ページに記述されており、N 99はShimada等、J. Mol. Biol.(1972年)93巻、483~503ページに記述されている。MS 439はtrp E 5947変異を持つYMC株である。MS 3067はMS 439であり、機能 Cre 遺伝子を持つラムダ-*imm434*-PIプロファージを持つ。細菌増殖用増地(すなわちL-プロス及びL-amp増地)はMiller, Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972)に記述されている。

ファージ法

用菌バクテリオファージとファージは互換的に使用される。ファージリゼートの調製、ファージ遺伝的交換の作成、ファージ組換え試験の実施及びファージ増殖化を促させるPIファージ(PIバクテリオファージ、PI)操作はSternberg等によりJ. Mol. Biol.(1980年)187巻、197~212ページ、及びSternberg等によりJ. Mol. Biol.(1987年)194巻、453~488ページに記述されている。

DNA調製と操作

20 kbより小さいプラスミドDNAをE. coliから(1)

これらの株においてバクテリオファージを生産するPIの能力も表に示されている。インビトロでPIファージにDNAを包み込む能力と共に、任意のこれらの菌からDNAを直接パッケージ用ベクター中にクローン化し、前記DNAをPIビリオン中に包み込み、次いでこれをPI注入に熟成したこれらの菌に戻すことも可能である。このすべてはE. coliで挿入DNAを複製することなく実行され、前記菌中では挿入DNAがその元の宿主に入った場合それを制限酵素から保護するメチル化パターンの喪失が起こる。

菌菌株と増地

E. coliのDH5デルター-lacU169、W3350、MS439、N 99、JM101、JM109、594及びYMC株、及びその調製はプラスミドとファージPIの宿主の役割をすることができ。DH5デルター-lacU169はLifton BiogeneticsのDr. Michael Bermanから入手したが、この株はDH1の変異株であるDH5の調製株であって、Hanahan, J. Mol. Biol.(1983年)168巻、557~580ページに記述されている。B5591はCre遺伝子を含むpRR103から組み立てられるラムダ-*imm434*-PIプロファージを持つDH5デルター-lacU169(以後DH5と呼称する)である。pRR103変異株はSternberg等によりJ. Mol. Biol.(1986年)187巻、197~212ページに記述されている。B5591はlacIqレプレッサー遺伝子を食べない。JM 101とJM 109はNA 01915、Beverlyに存在するNew England Biolabsから入手し、

Holmes & QuigleyによりAnal. Biochem.(1981年)114巻、143~197ページに記述された迅速法(以後迅速プラスミド調製と呼称する)、又は(2)Gordon及びVapnek, BNA(1973年)289巻、156~522ページに記述された塩化セシウム密度勾配法により調製した。20 kbより大きいプラスミドDNAはBirnbol等、Nucl. Acids Res.(1979年)7巻、1513~1523ページの方法により調製した。細菌DNAはE. coliからSternberg等、J. Mol. Biol.(1987年)194巻、489~497ページにより記述されたように準備した。DNAの大きさを200 kb以上に維持するため、この準備過程の間断力を避けるように注意した。パルスフィールドアゲロースゲル電気泳動をCarle等、Science(1988年)232巻、65~88ページにより記述されたように実行した。DNAの制限酵素消化とT4 DNAリガーゼによるDNA連結反応は発光者が明示したように実施し、この場合発光者はNew England Biolabsであった。DNAを操作するすべての他の方法はManiatis等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100, Cold Spring Harbor, NY 1982)により記述されている。

サザン分析

DNAをアゲロースゲルからニトロセルロース膜に移し、Southern, J. Mol. Biol.(1975年)98巻、503~507ページの方法により特異的に付着したDNA断片又はプラスミドでプローブし、前記方法は以後「サザン分析」と呼称

する。

制限分析

500ナノグラムのDNAを20マイクロリッターの酵素購入先であるNew England Biolabs (Beverly, MA 01915) が提供した緩衝液中で、37℃で2時間1〜2単位の制限酵素で消化した。反応を0.25%ブROMフェノールブルー0.25%キシレンシアノール、及び40%(v/v) シュクロースの溶液の3マイクロリッターを加えて停止し、次いで反応物を70℃で5分間加熱した。この試料をTris-Borate-EDTA緩衝液(0.089M Tris-Borate, 0.089Mホウ酸, 0.002M EDTA)に浸漬した1%アガロースゲル(15×15 cm)のみに添加した。電気泳動を20ミリアンペア(30ボルト)でキシレンシアノールのバンドがゲルの行程の3分の2移動する通常の12時間電圧で実行した。次いでゲルを具象エタジウムの0.5マイクログラム/μlの溶液中で30分間染色し、ゲルの面を遠紫外光線(320nm)とポラロイド型57フィルムを使用して撮影した。

DNAのアルカリホスファターゼ(AP)による処理

前章で記述したようにDNAを制限酵素で消化した後、これを70℃で5分間加熱した。反応物を37℃に冷却し、10mM Tris-HCl(pH8.0) 溶液中100マイクロリッターにし、次いでワシ菌アルカリホスファターゼの0.01単位と共に37℃で1時間インキュベートした。反応物を等量のフェノールで4回及び等量のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)で1回抽出し、次いでDNAを1M LiCl、

中で2量のエタノールと共に-20℃で3時間沈殿させた。

断片のベクターへの連結と挿入

連結反応を8 mM Tris-HCl (pH7.5)、5 mM MgCl₂、5 mMジチオスレイトール、1 mM ATP、100マイクログラム/μlワシ血清アルブミンを含む20マイクロリッターの溶液中で実施した。適量の溶液中へ形質転換により回収されるプラスミドへの断片の挿入を含む反応のため、100 μgの消化したベクターDNAと100〜400 μgの挿入断片を使用した。インビトロファージパッケージにより回収されるプラスミドベクターを含む反応のため、500 μgのベクターDNAと1〜5マイクログラムの挿入断片を使用した。400単位のT4リガーゼを各反応物に添加し、この反応物を16℃で20時間インキュベートした。反応を70℃で10分間加熱して停止した。

形質転換体の選択

*E. coli*株を(1)Mandel及びHiga, J. Mol. Biol. (1970年) 53巻、159〜162ページの方法、又は高い効率が要求される場合(2)Hanahan, J. Mol. Biol. (1983年) 166巻、557〜580ページの方法により形質転換した。0.1 μgの溶液中の形質転換した細胞を1 μlのL-プロスで希釈し、37℃で1時間インキュベートした。培養の100〜200マイクロリッターをカナマイシン(25マイクロリッター/μl)又はアンピシリン(150マイクロリッター/μl)のいずれかを含むL-希天平板上に塗布、平板を37℃で16時

間インキュベートした。次いでコロニーを計数した。Amp^r形質転換体のカナマイシンを添加したL-希天平板上の発育を試験し、逆も行った。

形質転換細胞の選択

*E. coli*株を、(1)MandelとHiga (J. Mol. Biol. 53, 159〜162 (1970)) の方法、又は高い効率を要する場合には(2)Hanahan (J. Mol. Biol. 166, 557〜580 (1983)) の方法に従って形質転換した。0.1 μgの溶液中の形質転換細胞をL-プロスで1 μlに希釈し、37℃で1時間インキュベートした。100〜200マイクロリットの培養液をカナマイシン(25 μg/μl)又はアンピシリン(150 μg/μl)を含むL-希天平板上に広げて、その平板を37℃で16時間インキュベートした。次いで、コロニーを採集した。Amp^r-R形質転換細胞を、カナマイシンを含むL-希天平板上での増殖、及びアンピシリンを含むL-希天平板上での増殖に関して調べた。

プラスミドベクター、pNS358-lytの構築

ベクターの構築における暫々の工程を記したフローシートを第3図に示す。開始プラスミドはpBS69であった。それは、同一方向に配向された2つのloxP組み換え部位を含む4.9 kbプラスミドであった。Cre蛋白質の存在下では、これらの部位の間に組み換えが起きて、DNAの2つの断片を生じ、その各々は1つのloxP部位と、pBS69におけるloxP部位間のDNAの2つの領域のうちの1つとを含む。以後、amp^r-Rドメインと呼ばれるこれらの断

断領域の一方は、薬剤アンピシリンに対する耐性と、プラスミドpBR322 (以後、pBR322oriと呼ぶ)のDNA複製系(レプリコン又は複製のオリジン(ori))とをコードする遺伝子を含む。他方のpBS69のloxP部位間の断断領域は、酵母菌 leu2^{-} 遺伝子を含む。

(a) pBS69へのP1パッケージング部位pacの挿入

DNAパッケージングの開始に必要なP1配列は、DNAの161 bpセグメント(pac部位)に局在した。DNAのこのセグメントは、Sternberg等 (J. Mol. Biol. 194, 469〜479 (1981)) によって記載された二重欠失複製体(デルター3-デルター20)に保存するP1配列を示した。デルター3-デルター20 DNAを制限酵素XhoI及びSalIで消化し、161 bp pac部位を含む437 bp断片を単離して、pBS69 DNAのamp^r-Rドメイン内の独特のXhoI部位に結合した。その結果生じたpBS69-pacプラスミドは、第3図に示されているように、パッケージングが反時計回りに起こるように配向されたpacを含む。pacに加えて、437 bp挿入体は、pBR322マッピング座標の375及び651の間に位置するテトラサイクリン遺伝子配列を含む。さらに、437 bp DNA断片中に存在し、またpacとプラスミドDNA内のpBR 322配列との間に位置するBamHI部位を欠失した。BamHI部位の除去により、pBS69-pacプラスミドが単一pBS69 BamHI部位しか有していないことが確認された。

(b) pNS 20を生成するためのTn903カナマイシン耐性遺伝子のpB569-pacへの挿入

Tn903カナマイシン耐性(kan-R)遺伝子を、1.3kb AccI断片として、PL-Biochemicals(ワイソコンシン州ミルウェーキー)から購入したプラスミドpuc4Eから単離した。pB569-pac DNAを制限酵素ClaIで消化したが、これはそのDNAを酵母菌lae2遺伝子内で1回切断した。等量(100ng)のその消化プラスミドDNA及びkan-R遺伝子断片を20μl中に混合し、16℃で一晩培養させた。結果混合物を用いてDB5株細胞を形質転換し、kan-R, aap-R形質転換細胞を選択した。これらの形質転換細胞から作成される迅速プラスミド調製物の分析により、それらは全てpB569-pacのClaI部位でkan-R遺伝子を含有することが示された。その後の金手技のために選択され、以後pNS 20と呼ばれるプラスミドは、kan-R遺伝子の方向が反時計回りであるように配向されたkan-R断片を含有した(第3図)。このkan-R遺伝子を含むloxP部位と側面を接する領域は、以後、kan-Rドメインと呼ぶ。

(c) pNS150を生成するためのP1プラスミドレプリコンのpNS20への挿入

P1マップの座標59及び66(第2図)の間に位置するDNAの7kb KpnI断片を、P1ファージからのDNAをKpnIで消化した後、単離した。それをpNS20の特定のKpnI部位に結合し、プラスミド中のその存在を、迅速プラスミド調製物の制限酵素消化物を分析することによって確認した。

に、この断片のBamHIを有するDNAへの結合は、挿入体の一方の側においてはBamHIを再生したが、他方においては再生しなかった。本断片をBamHI-開裂pNS150 DNAに結合し、挿入体の存在を、5つの制限酵素BamHI、XbaI、NotI、SalI及びSnaBIの各々によって1回だけ開裂されるプラスミドの能力によって確認した。その後の手技のために選択された特定の複製物はpNS358と呼ばれ、プラスミド上で反時計回りに配向されたBamHIからSnaBIまでのポリリンカーを有した(第3図)。

(e) pNS358-lytを生成するためのP1細菌レプリコンのpNS358への挿入

P1細菌性レプリコンを、正常P53プロモーターがlacZプロモーターに置換された1.9kbのAseI断片(P1マップ座標53-55)としてクローン化した。したがって、P1細菌レプリコンは、lacZプロモーターの制御下に置かれた。lacZプロモーターは、次に、lacIクリプレッサーによって制御される。IPTG(イソプロピルβ-D-ガラクトシド)の存在下では、lacIクリプレッサーは抑制解除され、レプリコンが顕能になる。lacZプロモーター-調節P1細菌レプリコンをプラスミドpNS42からPvuII-BpaI断片として単離し、SnaBI消化pNS358 DNAに結合して、pNS 358-lytプラスミドを生成した。レプリコン(P1マップ座標53-55)は、プラスミド内で反時計回りに配向した。P1パッケージング抽出物を生成する際に用いるファージ及び宿主菌の複製及び特性

その後の手技のために選択された特定の複製物はpNS150と呼ばれ、プラスミド中で反時計回りに配向されたマップ座標59から66までのP1 DNAを含有した。7kb P1挿入体はプラスミド複製系だけでなく、その分配系をも含有した(Yarmolinsky and Sternberg, in "The Bacteriophages", Chapter 9, 1988)。

(4) pNS358を生成するためのポリリンカークローニング部位のpNS150 DNAへの挿入

種々の配列を有する2つの3'末端オリゴデオキシヌクレオチドを、ホスホラミダイト法によって合成した。100μl(10mMトリス塩酸緩衝液, pH8.0, 1mM EDTA)の容量中の10μgの各オリゴヌクレオチドを、70℃で10分間、相互にアニーリングした。

その結果生じた2本鎖断片を以下に示す:

GATCCTCTAGAGCGGCGCGCTCGACTACGTA
GAGATCTCGCGGCGCGAGCTGATGCATCTAG
XbaI NotI SalI SnaBI

DNAのこの断片は、左から右へ、次の制限エンドヌクレアーゼ部位:

XbaI (X)-AGATCT; NotI (N)-CGCGGCGG;
SalI (Sa)-CAGCTG; SnaBI (Sn)-ATGCAT

を含有する。これらの部位はどれも、pNS150のDNA中には存在しなかった。本断片はまた、BamHI消化によって生成される末端と相補的な1本鎖GATC末端を含有する。本断片のGATC末端に対するヌクレオチド3'が異なるため

P1パッケージング抽出物の調製のための宿主菌細胞(宿主菌)を複製するために用いるファージは、4株の突然変異株P1ra-cm-2cl.100 9.16又はP1ra-cm-2cl.100 10.1であった。個々の突然変異株の特性、及び最終ファージにおけるその組み込みの理由を以下で考察する。

(a) cl.100. Rosner(Virology, 48, 679-689(1972))によって最初に記載されたこの突然変異は、ファージclリプレッサーを温度感受性にする。したがって、このP1プロファージを含有する宿主菌は一般に33℃以下の温度で増殖するが、しかし宿主菌周期に入るよう導入されて、より高い温度でファージを産生する。例えば、培養液の温度が33℃から40℃に上昇した場合には増殖はその温度に保たれて、細胞溶解が切替えてから50分以内に起り始め、約100ファージ/細胞が放出される。

(b) ra⁻. Glover等[Genet. Res., 4, 480-482(1963)]によって最初に記載されたこの突然変異は、ウイルスの複製及び修飾系を不活性にする。それは、P1細菌菌から作成される抽出物が、パッケージされる前に付加されたDNAを破壊し得る制限エンドヌクレアーゼ活性を含有しないようにここで用いられるファージに組み込んだ。

(c) cm-2. この突然変異はTidaとArber [Mol. Gen. Genet., 153, 259-260(1977)]によって記載されていて、そのクロロムフェニコール耐性(cm-R)遺伝子を伴うTn9トランスポゾンがP1マップ座標24で挿入され、マップ座標24と33の間のP1 DNAの10kb部分を欠失した大量

染色体転位である。本突然変異は、培養中の導入後に、細胞を別の方法でできるよりも遅い時間に採集可能であるようにファージを部分的に培養欠陥性にする。この突然変異体の別の特性は、それが野生型PIよりも多くの小環型ファージ変異株を産生することである。

(d) *aa* 9.16及び*aa* 10.1, PIアンバー (*aa*) 突然変異株10.1は、PI遺伝子10中にナンセンス突然変異を含有し(第2図参照)、全“後期”ファージ蛋白質合成に欠陥がある。それは、正常量のpac-開閉活性を産生する。PIアンバー突然変異株9.16は、PI遺伝子9中にナンセンス突然変異を含み、pac-開閉活性の産生に欠陥がある。それは、正常では、ファージの頭部及び尾部を含めたファージ形形成蛋白質を産生する。これらの突然変異株の何れか1つから調製される抽出物が*in vitro*でDNAをパッケージングできるとは期待しないが、しかし両抽出物とともに、パッケージに必要な成分を全て有するべきである。

2工法で、4個体ファージ変異株を調製した。先ず、ファージP1 ϕ cm-2と、P1 ϕ 1.100 9.16又はP1 ϕ 1.100 10.1とを交叉させて、3つの突然変異、P1 ϕ cm-2 ϕ 1.100 9.16又はP1 ϕ cm-2 ϕ 1.100 10.1を含有する組み換えファージを選別した。この交叉によって産生されたファージを用いて、TMC株の細菌感受性上にブランクを生成し、個々のブランクを次の3つの特性：(1)*cm*-Rである培養菌を産生する能力；(2)温度感受性；及び(3)細菌のN99株上ではな

くTMC株上にブランクを作る能力；に関してスクリーニングした。TMC株はアンバーサブレッサーを含有したが、能力N99株は含有しなかった。アンバー変異組み換え株が正しいアンバー変異を含有することを確認するために、コントロール9.16及び10.1ファージを用いた相補性試験を実施した。同一遺伝子内のアンバー変異株はファージ産生に関しては互いに相補的でないが、遺伝子9及び10のように異なる遺伝子におけるものは、相補的である。相補性試験によって、3個体変異株におけるアンバー変異はそれらの変異株を生成するために用いるファージに基づいて予期されることが確認された。3個体変異株を次にP1 ϕ cm⁺と交叉して、4個体変異株が3個体変異株の全特性に加えて、任意のE. coli株中にプロファージとして存在する場合は、ラムダファージの増殖を制限することができない特性を有することが確認された。

4個体PI変異株を用いてN99株を感染し、9.16及び10.1変異株に対してそれぞれNS2961及びNS2962と呼ばれるその培養菌を用いて、*in vitro*パッケージング反応のためのPI抽出物を調製した。さらに、これらのPI変異株はまた、それらの取込みに敏感した任意の細菌株を感染化するのに用い得る。

PIパッケージング抽出物の調製

(a) 10.1又はpac-開閉プロフィシエント(*pcp*⁺)抽出物の調製

1リットルのL-ブイヨンにNS2962株、細菌のコロニーを植え込み、その培養を32°Cで0.8のOD650に増殖させた。つぎに培養の温度を90°Cの水浴中でそれを調整された温度まで42°Cに急速に上げ、激しく攪拌しながら42°Cで15分間増殖を継続した。つぎに培養の温度を、38°Cの水浴中に入れて低下させ、激しく攪拌しながらさらに165分間増殖を継続した。次いで、細菌懸濁液を水スラリー中で4°Cに急冷し、Sorvall GSAローター内で4°Cで10分間、6000×gで遠心分離して小球状にした。細胞小球を、20mMトリス-塩酸、pH8.0、1mM EDTA、50mM NaCl、及び1mMフェニルメチルсульホニルフルオリド(PMSF)から成る2mMの緩衝液中に再懸濁した。再懸濁細胞を、40秒間隔で5部、5にセッティングしたBranson音波処理装置の中等出力で水上で音波処理した。各音波処理バーストの間は、試料を80秒間水上に置いた。つぎに音波処理抽出物を34,000×gで30分間遠心分離し、その上清を10mMアリコートに分けて、-80°Cで凍結保存した。これらの抽出物は、通常、菌液の凍結-及び-解凍に対して安定であった。

pcp⁺パッケージング抽出物のpac-開閉活性

pac開閉を測定するために、800bpデルター3 pac断片を用いたが、これはその右末端にpac部位を含有してい

た(第4A図；Sternberg and Coulby, J. Mol. Biol. 194, 469~479(1987))。その断片を両末端で、ポリヌクレオチドキナーゼを用いることによってガンマ³²P-dATPで標識し、つぎに*pcp*⁺抽出物の量々のアリコートを置いてインキュベートした。反応は、10mMトリス-塩酸、pH8.0、50mM NaCl、10mM NaCl、1mM DTT、1mM ATP、1mMの標識化pac断片(12pg/mg)を伴う10pgの音波処理後ウシ胎児DNA、及び抽出物を含まないか又は0.01~1mgの*pcp*⁺抽出物(3.4mg蛋白質/mg)から成る溶液15μl中で実施した。反応混合物を30°Cで15分間インキュベートし、そして0.2%の濃度までSDSを加えてその混合液を70°Cで5分間加熱することによって反応を停止した。その反応の生成物を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。試料を垂直の5%ゲルのスロットに入れ、150ボルトで4時間電気泳動処理した。つぎにゲルを乾燥してKodak XRPフィルムに一晩露出した。第4B図に示されている結果は、1mgの抽出物(レーン2)は約20%の断片を切断し、付加抽出物(レーン1)なしではそのレーンでは観察されない2つの新断片を生成することを明示している。その抽出物の10倍希釈(レーン3)は辺縁部のみ切断断片の量を低減したが、しかし、さらにその抽出物を10倍に希釈すると(レーン4)、切断能力が約5%に低減した。

(b) 9.16又は頭-尾プロフィシエント(*hlp*⁺)抽出物の調製

上記(a)に記載のように1リットルのレプリコンにNS2961細胞のコロニーを植えつけ、培養を増殖、導入した。温度を42℃に切り換えてその温度で15分間培養をインキュベート後、温度を38℃に戻し、その後45分間インキュベートした。培養を半分に分けて、細胞を(a)に上記のように小量化した。培養の半分からの細胞懸液を、20mM トリス-塩酸、pH8.0、50mM NaCl、1mM EDTA、5mM MgCl₂、1mM PMSF、及び5mM ベータ-メルカプトエタノールを含有する1mMの緩衝液中に再懸濁し、(a)に上記のように管状処理した。100μlのアリコートを買機-80℃に凍結した。培養の他の半分からの細胞は、50mM トリス-塩酸緩衝液、pH7.4、及び10%シロの糖液1μl中に再懸濁し、つぎに2回、凍結及び解凍した。凍結は液体窒素中で実施し、凍結細胞は室温で解凍した。次いで、酵母リゾチームの8mmoles/μl (10mg/ml)を解凍細胞に加え、4℃で15分後、管状処理液抽出物のために用いる200μlの緩衝液を加えた。全ての成分を4℃で5分間、激々に混合した後、抽出物の100μlアリコートを買機-80℃に凍結した。

細胞を培養する前に、NS2961株の場合よりも長期間、細胞NS2962株を導入したことに留意すべきである。これは、NS2962株における10.1アンペリ変異が、両細胞株に認められるcm-2変異の場合よりもさらに創的に細胞溶解を阻害するためであった。したがって、導入されたNS2962株細胞は導入後4時間は溶解しなかったが、一方導

入されたNS2961株細胞は導入後約80-100分で溶解を開始した。実際上、遠心分離工事中に細胞を溶解しないよう、遠心分離によって小量化される前に導入されたNS2961細胞を急冷するよう注意すべきである。

ベクターDNAが形質転換型BS591細胞中のCreの影響を受けるということの立証

本明細書で記載されるベクターが、Creリコンビナーゼを含有する細胞中に導入される場合に予期されるようにプロセッシングされるということを立証するために、pNS20及びpNS358をE. coli DH5株及びBS591株中に導入した。DH5は機能cre遺伝子を含有しなかったが、一方BS591は機能cre遺伝子を含有した。amp-R及びkan-Rに形質転換した結果を表2に示すが、これは、Creが細胞中のこれらのプラスミドの2つのドメインを効率よく溶解し、そして各ドメインは、回収するべきものである場合にはレプリコンを含有しなければならない、ということを示している(図5A図参照)。

表 2

プラスミド	kan-Rドメイン中のレプリコン	形質転換株			
		BS 591(cre ⁺)		DH5(cre ⁻)	
		amp	kan	amp	kan
pNS20	なし	1.4	0.002	1.2	1.0
pNS358	P1プラスミド	0.6	0.5	0.4	0.5

BS591株を、amp-Rドメイン中にのみレプリコンを保有するpNS20で形質転換した場合、amp-R形質転換の効率はkan-R形質転換の効率よりも約1000倍高かった。DH5株の形質転換の結果は、これがloxP部位間のCre仲介組み換えによる2つのドメインの分離によるものである、という結論を支持する。この場合、pNS20によるamp-R形質転換とkan-R形質転換の効率は同じであった。kan-Rドメインが、プラスミドpNS358の場合と同様にレプリコンを保有する場合には、kan-R及びamp-R遺伝子はともに、BS591株の形質転換細胞の間に等しく表現される。さらに、BS591のkan-R形質転換細胞の約20-30%がアンピシリン感受性であり、同様のamp-R形質転換細胞がカナマイシン感受性であった。予期される通り、pNS358 DNAによるDH5(Cre⁻)の形質転換細胞はすべて、amp-R及びkan-Rであった。これらの実験における形質転換の1単位は、使用したDNA1μg当たり10⁴個の形質転換細胞を表わすことを意味した。

BS591中のpNS358のDNAの溶解に関する物理的証拠(図5B図)は、BS591及びDH5の形質転換細胞に由来するDNAの迅速プラスミド試料の制限分析から得られた。全DNAを制限酵素XhoIで消化し、その結果生じた断片数をアガロースゲル電気泳動法及びサザンハイブリダイゼーションによって測定した。DH5のamp-R、kan-R形質転換細胞(レーン1)に由来するプラスミドDNAは、オリジナルpNS358プラスミドと区別できなかった。それらはとも

に、予期される3つのXhoI断片を含有した。これに対してBS591のamp-R、kan-R形質転換細胞からのプラスミドDNAは、単一XhoI部位のみを伴うDNAを含有したが(レーン2)、一方BS591のkan-R、amp-R形質転換細胞からのプラスミドDNAは2つのXhoI断片を含有した(レーン3)。BS591のamp-R、kan-R形質転換細胞からのプラスミドDNA(レーン4)は、3種類のDNA、即ちpNS358と同様のDNA、単一XhoI部位を有するamp-RドメインプラスミドDNA、2つのXhoI部位を有するkan-RドメインプラスミドDNAを全て含有した。予期の通り、pNS358のまさにkan-Rドメインを有するプラスミドDNAは、pNS358 DNA又はamp-RプラスミドDNAの場合よりも非常に少量で(即ち、DNAバンドは非常に薄く)回収された。kan-Rドメイン中のP1プラスミドレプリコンは、amp-Rドメイン中のpBR322レプリコンよりも非常に少量のコピー数にDNAを複製した。

Pcp⁺及びhlp⁺抽出物によるDNAパッケージングの立証
純化ベクター(pNS358)DNAのパッケージング

5μgのkanRI消化pNS358 DNA(100μg/ml)を一晩抽出して、50kb-150kbの大きさのコンカチマーを生成した。30μgのこのDNAを、インキュベーション時間が15分ではなく60分であったことを除いては、前章に記載された通りに、0.2μlのpcp⁺抽出物でインキュベートした。インキュベーション終了時に、8mM トリス-塩酸、pH7.4、15mM ATP、18mM MgCl₂、60mM スペルミジン、80mM グトレシン、及び30mM ベータ-メルカプトエタノールを含む2

80の融解液を、800の濃縮-解水hlp抽出物とともに反応に加えた。その結果生じた融合液をさらに60分間、30℃でインキュベートした。この時間の終了時に、TMC(10 mMトリス-塩酸、pH7.5, 10mM MgSO₄, 0.1%ゼラチン)でその反応液を150μlに希釈し、DNaseIを10μg/mlの濃度まで加えて未パッケージ化DNAを全て破壊した。5μlの上記パッケージ化DNAをBS591の10⁴個の細菌細胞に加え、その結果生じた融合液を30℃で10分間インキュベートして、ファージ懸濁液を起こさせた。その結果生じた感染細胞をLブイヨンで2mlに希釈して、37℃で1時間増殖させ、遠心分離によって小球化し、次いでL-amp寒天平板上に広げた。一晚インキュベート後、平板は2208のコロニーを含有した。これは、2×10⁴パッケージ化DNA分子/付加ベクターDNA(μg)のパッケージ化効率に相当した。パッケージ化ベクターを査定するために用いた細菌株がDN5 (Cre⁻)であった場合には、検出されるamp-Rコロニーの数は約40倍低減したが、これは、loxP部位間のCre仲介組み換えが、注入された線状DNAを環状化するためには必要であることを示している。2つの抽出物のいずれかがパッケージ化反応から除外された場合には、amp-Rコロニーは検出されなかったが、これは両抽出物がパッケージ化には必要であることを示している。濃縮-解水hlpの代わりに管状処理hlp抽出物を用いた場合、パッケージ化効率は変わらなかった。しかしながら、管状処理抽出物が濃縮-解水抽出物

よりも安定度が低いことが立証されたので、その後の実験は全て、濃縮-解水抽出物を用いた。最後に、amp-Rコロニーの分析から50% (1/2)がkan-Rでもあったことが示されたが、これは、細菌に、pNS358の抗生物質耐性ドメインがパッケージ化されたことを示している。

ベクターによる細菌の感染

一晚培養した100μlの細菌 (2~3×10⁸細胞/ml) をファージ懸濁液のアリコート、又はin vitroパッケージ化反応液で、30℃で10分間インキュベートした。ファージを査定する場合は、3.0mlの懸濁液を最上寒天 (0.7%寒天) を55℃で感染細胞に加え、その融合液をL-寒天平板上に広げた。最上寒天を室温で5分間固化した後、平板を37℃で16時間インキュベートし、ブラックを録画した。抗生物質耐性細胞を査定する場合は、感染細胞を抗生物質含有L-寒天平板の上に広げ、これらの平板を37℃で16時間インキュベートした。

in vitroパッケージ化及びCre⁺細胞の形質転換後pNS358 DNAにクローン化された外生DNA断片の回収

E. coli DNAのクローン化挿入体を有するプラスミドを2つの方法で回収した: (1) プラスミドDNAを、Birnboim等 (Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523(1979)) のアルカリ性溶解プロトコールにより、そして塩化セシウム異化エタジウム平衡遠心分離 (これはManiatis等 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100, Cold Spring

Harbor, NY, 1982)が記載した)によつて、一晚増殖させて2~3×10⁸細胞/mlになった細胞1mlから単離した。DNAを勾配液から除去した後、それを塩化セシウム-糖和イソプロパノールで4回抽出し、10mMトリス-塩酸、pH8.0, 1mM EDTAの濃度1μlに対して4℃で5時間透析し、フェノールで2回抽出して、つぎに1M LiCl₂に溶解した2巻のエタノールで沈殿させた。(2) クローン化挿入体DNAを有するプラスミドを、細菌をPIファージで感染させることによってファージ粒子の形で形質転換細胞から回収した。感染中のPI DNAは、Cre仲介組み換え工法によって細胞中の残留プラスミドと組み換えを生じ、両DNA上にloxP部位を生じた。この出来事により、クローン化挿入体-プラスミドに隣接したPI pac部位が突きとめられ、それによってそれをファージ粒子中にパッケージ化することができた。一晚培養した100μlの形質転換細胞 (約2×10⁸細胞) を6×10⁴PIファージとともに30℃で10分間インキュベートし、次いでL-ブイヨンで5mlに希釈した。感染細胞を、細胞溶解が観察されるまで (約90分間)、37℃で激しく振盪した。pNS358のkan-Rドメインとともにクローン化断片を含有するファージの数を、BS591を溶解物のアリコートで感染させることによって査定し、つぎに産生されたkan-R細胞の数を測定した。溶解物中のブラック形成中のファージを、前記のように測定した。通常、これらの溶解物中のkan-Rファージ対ブラック形成ファージの比は約0.1~1

%であった。

kan-R遺伝子、PIプラスミドレプリコン、及びPI溶解レプリコン、pNS364を含有するプラスミドの増殖

このプラスミドの増殖を第8A図に示す。われわれは、本明細書においてはこれを、lacZ遺伝子プロモータによって調節されるクローン化PI溶解レプリコンが細胞中のプラスミドコピーの数を容易に増殖するために使用し得ることを示すために用いた。JM109株(lacIq)をpNS364 DNAで形質転換して、その形質転換細胞をL-ブイヨン中で増殖させた。これらの条件下では、プラスミドは1コピー/細胞染色体でプラスミドレプリコンによって保持されると予測された。IPTGをその増殖に加えた場合は、lacIqレプレッサーが不活性化され、したがって、lacZプロモーター及びPI溶解レプリコンを活性化する。JM109 (pNS364) の培養60μlをL-ブイヨン中で37℃で5×10⁷細胞/mlの密度に増殖させ、つぎに各々5μlの8つのアリコートに分けた。1つのアリコートをL-ブイヨン中で37℃でさらに3時間増殖させ、一方他の7つのアリコートを各々、10μl each ~ 1mMの濃度範囲のIPTGを用いて3時間、L-ブイヨン中で増殖させた。全ての細胞DNAを管状液から単離し、制限酵素BamHI (これはpNS364を2つの断片に切断した) で消化して、サザンハイブリダイゼーションによって分析した。その結果 (第8B図) は、培養中のIPTG濃度が増大するとプラスミドのコピー数も増大することを示した。1mM IPTGでは、プラスミドの

コピー数は、IPTGを欠いた培養中のプラスミドのコピー数よりも30~40多かった(レーン1とBを比較)。

実施例 1

E. coli DNAの断片をpNS358に挿入し、キメラベクターDNAをパッケージングし、細菌をバック化キメラベクターで形質転換し、形質転換細菌を選別して、挿入DNA断片を回収する

2 µgのpNS358 DNAをBamHI又はNotI制限酵素で消化した。これらの酵素は各々、ベクターDNAをポリリンカーターローニング部位で1回切断した。つぎに制限DNAをアルカリ性ホスファターゼで処理して、その後の結核反応における再結核の再結核を防止した。挿入DNAの供給源はE. coli B 3350株であって、単離DNAはそのサイズが200kbより大きかった。ベクターにおける任意のDNAの挿入に先立って、それを、Sau 3aIで平均サイズ20~50 kbに消化するか、あるいは制限酵素NotIで完全に消化した。ほぼ等量(200ng)のベクターDNAとE. coli DNA(Sau 3aI-消化E. coli DNAを有するBamHI-消化ベクター又はNotI-消化ベクター、及びNotI-消化E. coli DNA)を20µgの溶液中で混合し、一晚結核した。この結核混合液1 µlを「抽出物pcp*及びhtp*のパッケージングによるDNAのパッケージングの立証」という表題の章に記載されているようにパッケージし、これを用いて、「細菌のベクターによる結核」の章に記載されているように結核によって、E. coli B5591株を形質転換した。その結果生

アルカリ性ホスファターゼで処理されていないBamHI-又はNotI-消化ベクターDNAをバックアップする効率は、約 2×10^4 パッケージング化DNA分子/付加ベクターDNA(µg)であった。ベクターDNAをアルカリ性ホスファターゼで処理すると、バックアップ後のDNAの回収率は約100~200倍低下したが、しかしSau 3aI-又はNotI-消化E. coli DNAを結核反応液に加えて部分的にその喪失を回復してもよい。これらの結果を解釈すると、ホスファターゼ処理ベクターDNAは大型コンカチマーと結核できず、したがって効率よくパッケージング化され得ないということであった。E. coli DNA挿入体をベクターDNAに加えると、パッケージング化され得る大きさに達することができた。特定のパッケージング反応によって、50~90%のkan-Rコロニーがamp-Sであったが、これは、それらがpNS358のamp-Rドメインを欠いていたことを示している。

パッケージング化pNS358 DNA及びそれを含有するE. coli挿入体の回収及び特性

(a) Sau 3aI クロニン

pNS358に挿入されたSau 3aI-消化E. coli DNAをパッケージングすることによって生成された10個の別々のコロニーから増殖させた各培養中のプラスミドDNAを、Birbois等(Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523 (1979))のアルカリ性手法によって単離し、制限酵素消化によって分析した。プラスミドのうちの2つのDNAはpNS358

じた細菌を、表3に示すようにkan-Rコロニーとして検出した。

表 3

pNS358-E. coli DNAのin vitroパッケージング

In vitroパッケージング
反応液に付加するDNA

カナマイシン耐性コロ
ニー/ベクターDNA(µg)

B5591 DE5(cre-)

1. Sau 3aI 挿入体

pNS358-BamHI	<10 ⁴	
pNS358-BamHI+リガーゼ	2×10 ⁴	2.4×10 ⁴
pNS358-BamHI-AP+リガーゼ	2×10 ⁴	
pNS358-BamHI-AP + E. coli DNA-Sau 3aI	+リガーゼ	4×10 ⁴ 6.0×10 ⁴

2. NotI 挿入体

pNS358-NotI	<10 ⁴	
pNS358-NotI+リガーゼ	2×10 ⁴	4.2×10 ⁴
pNS358-NotI-AP+リガーゼ	1×10 ⁴	
pNS358-NotI-AP + E. coli DNA-NotI	+リガーゼ	1.8×10 ⁴ 8.0×10 ⁴

AP=アルカリ性ホスファターゼ処理DNA断片。

DNAのkan-Rドメインと同一であったが、しかし残りは、多数の新規制限断片を食めて、ベクター中に存在するよりも実質的に多くのDNAを含有した。ベクター(レーン3)、及びベクター-Sau 3aIキメラのうちの5つ(レーン4~8)の、制限酵素BclI、XhoI、PvuII及びEcoVによる消化物を表7A図に示す。レーン4~8で観察される新規DNA断片は、E. coli Sau 3aI断片の挿入によるものであると思われる。表7A図のレーン1及び2は、DNAサイズマーカーを含有した。単離された最大のプラスミドは、38~40kbであった。パルス野ゲル分析から、それは22kbと17kbの2つのNotI断片を含有することが示された(表7B図、レーン3)。レーン1はパッケージング化ベクターDNAを含有し、レーン2はNotIで消化された2分の1Sau 3aI-キメラを含有した。これらの結果は、Sau 3aI挿入体が小環型(PIS)粒子に全てがパッケージングされたわけではない場合は、その容量は40 kb以下であることを示唆している。

(b) NotI クロニン

Smith等(Science 236, 1448-1453(1987))が記載したE. coli DNAの最新のNotI制限マップには、E. coli DNAのNotI消化によって5つのDNA断片が生じることが示されている。これらの断片は、本発明のin vitro PIパッケージング系によってパッケージングされ得る。これらの断片は、大きさが20kb、40kb、43kb(このサイズの断片が2つ)、及び95kbである。NotI断片をpNS358 DNAに挿入

し、Sau 3a I 挿入体に関して記載したと同様に pNS358 図面内でそれらをクローニングした後、5つのクローンからのプラスミドDNAを調べた。クローン化プラスミドのうち2つのもののDNAは、pNS358のkan-Rドメインのみを含有した。他の3つのクローン化プラスミドからのDNAをNot I で消化した場合、それらがベクターのkan-Rドメインに加えて、30kb以上の大きさのNot I 断片を含有することが示された。これらのDNA中のNot I 挿入体の大きさは、パルスゲル電気泳動によってより正確に測定した。プラスミドの1つ(第7B図、レーン11)は、ゲル中で40 kbマーカーを伴って転位するNot I 挿入体を含有したが、一方他の2つ(第7B図、レーン9及び10)は、わずかに大きい42.5 kbマーカーを転位する挿入体を含有した。3つのクローンはすべて、ベクターのkan-Rドメインに対応する12 kb Not I 断片を含有した。43 kb挿入体を含有するクローンの1つのDNAは(レーン10)、6 kb Not I 断片を含有したが、この起源はE. coli 断片の場合のように明らかでなかった。レーン10に示されているプラスミドDNAの、Not I によってではなくBgl II 及びXho I による消化は、全体の大きさが60 kbを上回る断片群を産生したが、これはその大きさがNot I 消化物に基づく概算値であることを確認している(第7C図、レーン2)。それらの大きさに基づいて、Not I 挿入体を有する3つのプラスミドは、大きなPI(P1B) 膜部にパッケージングされていなければならないかった。

ブとしてtrpプラスミドDNAを用いてサザン分析した結果、プラスミドDNAは、真正E. coli DNA断片と大きさが同じである多数の断片を含有することが示された。レーン1、3及び5はE. coli DNAを含有し、レーン2、4及び6はtrpプラスミドDNAを含有した。断片がE. coli レーン中に存在し、プラスミドレーンには存在しなかった場合、もしくはこの逆の場合は、それらがベクター由来のものであったか又はそれらがベクターとE. coli DNAとの間の接合を誘起していたことを示す。総じて、これらの結果は、P1パッケージング系が107 kbの大きさのDNA(85 kb Not I 挿入体+12 kb プラスミドkan-Rドメイン)を収容し得るということ、そしてベクターが染色体外プラスミドとしてそのDNAを忠実に複製したということを示した。

実施例 2

クローン化DNA断片を増殖するためのpNS358-lytベクターの使用

2 µgのpNS358-lyt DNAをBamHI又はNot I で消化し、それを用いて、実施例1に記載されているように、それぞれE. coli DNAのSau 3a I 及びNot I 断片をクローン化する。実施例1におけると同様に、Sau 3a I 又はNot I 断片挿入体でベクターDNAをin vitroパッケージングした後、そのパッケージング化キメラDNAをNS2974株に注入し、kan-R形質転換細胞を選択する。個々のkan-R形質転換細胞のDNAを実施例1と、「in vitroパッケージング及

E. coliトリプトファン合成オペロンの遺伝子は、E. coli DNAの85 kb Not I 断片上に存在するが、その大きさの断片がin vitroでP1膜にパッケージングされ得ることを示すために使用した。Not I -消化E. coli DNAを用いてパッケージング反応に起因するファージは、ラムダ-P1: creプロファージを含有するE. coliのNS3067株(trp⁻)を感染するために用いた。その結果生じたkan-R菌落を単離し、それらがトリプトファンを欠いた最小培养基上で増殖し得るか否かを調べる試験をした。試験した50のうち2つが増殖した。そのプラスミドDNAを陽性クローンの1つから単離し、具化エチジウム染色(第8A図、レーン3~4)によって、又はパルス野ゲルのサザン分析(第8A図、レーン5~6)によって、E. coli trp遺伝子プロローブに対してハイブリッド化される85 kb E. coli Not I 断片を含有することを示した。レーン3及び5はNot I によって消化されたプラスミドDNAを含有し、レーン4及び6はNot I によって消化されたE. coli DNAを含有した。パルス野ゲルをkan-R遺伝子DNAでプローブした場合、12 kb DNA断片はtrpプラスミドDNAを含有するレーン(レーン7)には現われたが、しかしE. coli DNAを含有するレーン(レーン8)には現われなかった。その断片は、pNS358 DNAのkan-Rドメインに対応した。個々の制限酵素(Bgl II-Xho I、レーン1及び2、Hind II、レーン3及び4、Sma I、レーン5及び6)でtrpプラスミド及びE. coli DNAを消化し、その後プロ-

びCre⁺細胞の形質転換後のpNS358 DNA中にクローン化された外生DNA断片の回収(pp.27~28)の章とに記載されている通りに単離し、制限酵素消化及びサザンハイブリダイゼーション分析によってE. coli DNA挿入体を含有することを明示した。ベクター挿入体DNAがベクター中で溶菌レプリコンによって増殖され得るか否かを調べるために、キメラプラスミドを含むUNS2974株菌落の増殖を半分に分けて、1 mM IPTGを含む場合と含まない場合とで3時間増殖させた。増殖時間終了時に、全ての細胞DNAを2つの培養の各々から単離し、「kan-R遺伝子、P1プラスミドレプリコン及びP1溶菌レプリコン、pNS304を含有するプラスミドの増殖」という表題の章でプラスミドpNS304に関して記載したように、サザンハイブリダイゼーションによってプラスミドコピー数を測定した。IPTGを含有して増殖させた培養からのDNAは、IPTGを含まずに増殖させた培養から単離されたDNAの場合よりも20~30倍多いベクター挿入体プラスミドDNAを含有する。この結果は、CsCl-具化エチジウム平均密度勾配を用いて2つの培養から超らせん環状DNAを単離することによって確認される。

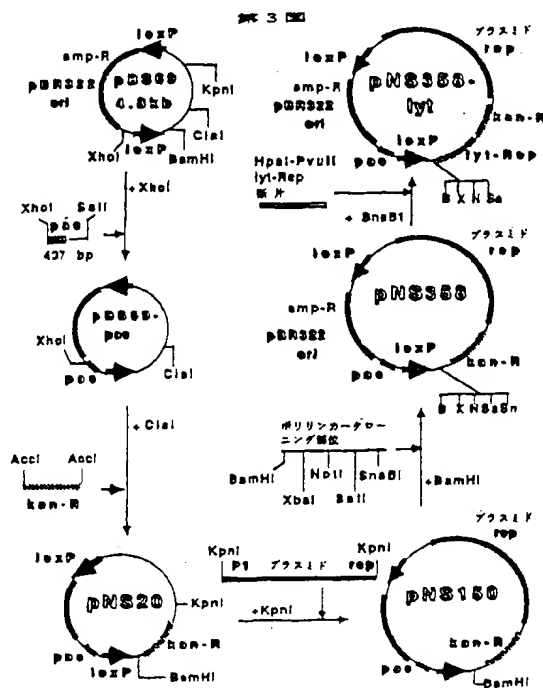
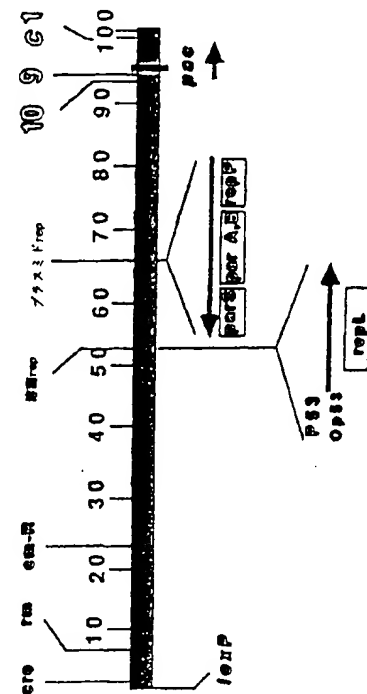
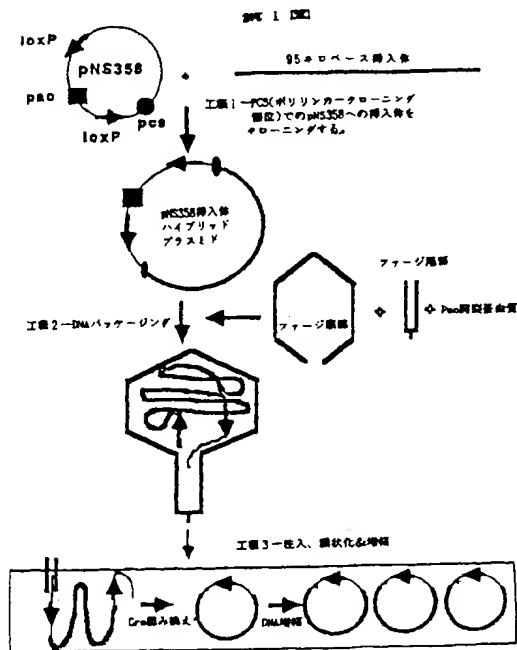


図 5

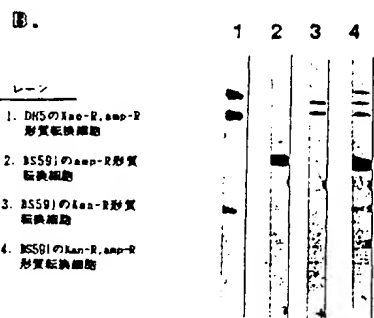
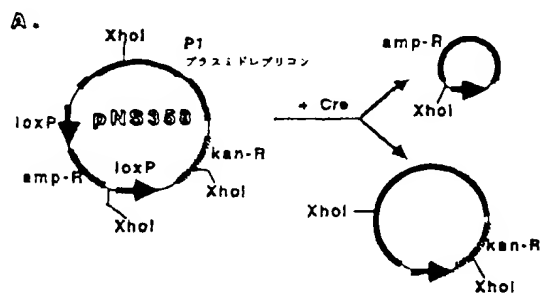


図 6

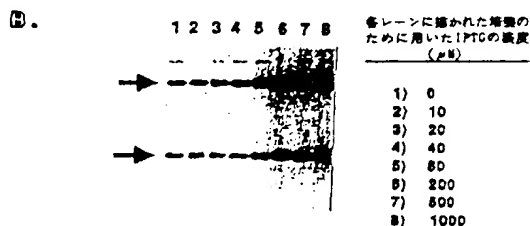
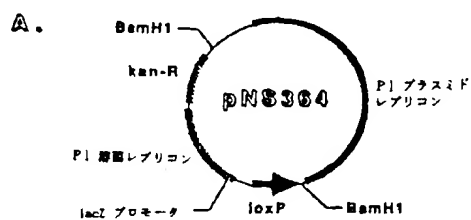


図 8

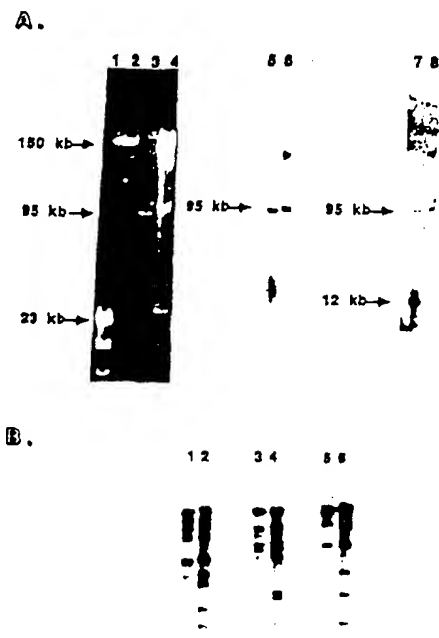
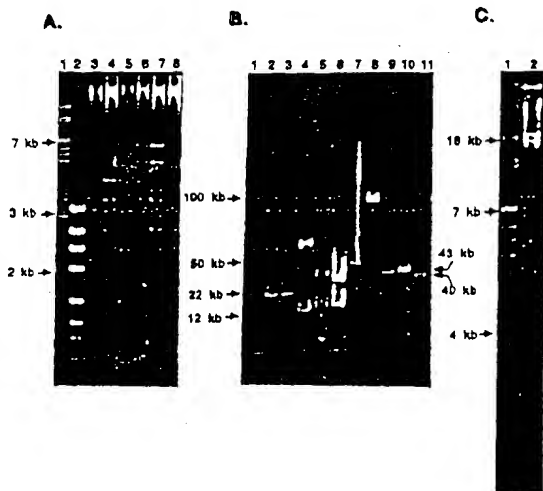


図 7



手続補正書(方式)

平成4年1月9日

特許庁長官 櫻 沢 亘 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第504972号
PCT/US 89/00368

2. 発明の名称

QSKB濃度の大きさをDNA断片用P1パク
テリオファージクロニング系

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国デラウェア州19898. ウィルミントン.
マーケットストリート1007

名称 イー・アイ・デュボン・ドゥ・ヌムール・アンド・
カンパニー

4. 代理人

住所 東京都千代田区麹町3丁目2番地(相互第一ビル)
電話 (3261) 2022

氏名 (9173) 高 木 千 恵 (72名)

5. 補正命令の日付

平成3年11月20日 (発送日 平3.12.10)

6. 補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による書面の特許
出願人の欄、代理権を証明する書面、明細書および
請求の範囲の翻訳文、ならびに発明者訂正

方式 (2)
審査

7. 補正の内容

- 1) 特許出願人の名称および特許出願人の代表者氏
名を別紙のとおり補正します。
- 2) 委任状および法人国籍証明書ならびにそれらの
訳文を提出します。
- 3) 発明者訂正 (別紙のとおり)
- 4) 明細書および請求の範囲の翻訳文の抄写・別紙
のとおり (内容に変更なし)

以 上

国際調査報告

<p>1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Classification of the International Search Report)</p> <p>IPC(4): C12N 15/00; C12N 1/20</p>							
<p>2. FIELD SEARCHED</p> <p>Classification System: International Patent Classification</p> <p>U.S.: 435/48, 91, 172, 1, 172, 3, 252, 3, 252, 31-252, 38, 252, 8, 849, 933/31, 37, 72, 73</p>							
<p>3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <p>Category: C (Other Publications) with abstracts; A (Patent Documents) with abstracts; B (Patent Documents) without abstracts</p> <table border="1"> <tr> <td>X</td> <td>W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Functional limits of pac and location of pac cleavage termini", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 469-475, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See entire document.</td> <td>5 1-4, 8-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>W. STERNBERG ET AL., "Bacteriophage P1 pac gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation", Journal of Molecular Biology, Volume 187, pages 187-213, published 20 January 1986 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.</td> <td>5 1-4, 6-14</td> </tr> </table>		X	W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Functional limits of pac and location of pac cleavage termini", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 469-475, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See entire document.	5 1-4, 8-14	X	W. STERNBERG ET AL., "Bacteriophage P1 pac gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation", Journal of Molecular Biology, Volume 187, pages 187-213, published 20 January 1986 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.	5 1-4, 6-14
X	W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Functional limits of pac and location of pac cleavage termini", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 469-475, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See entire document.	5 1-4, 8-14					
X	W. STERNBERG ET AL., "Bacteriophage P1 pac gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation", Journal of Molecular Biology, Volume 187, pages 187-213, published 20 January 1986 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.	5 1-4, 6-14					
<p>4. CLOSING STATE</p> <p>Date of mailing of the International Search Report: 28 June 1989</p> <p>Date of mailing of the International Search Report: 17 JUL 1989</p> <p>Signature of International Searcher: James MacNeill</p>							

<p>5. DOCUMENTS REFERRED TO BY CLAIMS (Continued from the Search Report)</p> <p>Category: C (Other Publications) with abstracts; A (Patent Documents) with abstracts; B (Patent Documents) without abstracts</p> <table border="1"> <tr> <td>X</td> <td>W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Differential processing of the cleaved ends in vivo", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 455-468, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.</td> <td>5 1-4, 8-14</td> </tr> </table>		X	W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Differential processing of the cleaved ends in vivo", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 455-468, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.	5 1-4, 8-14
X	W. STERNBERG ET AL., "Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (pac). II. Differential processing of the cleaved ends in vivo", Journal of Molecular Biology, Volume 194, pages 455-468, published 5 April 1987 by Academic Press (New York, NY, USA). See the entire document.	5 1-4, 8-14		

第1頁の続き

⑥Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/78

⑦発明者 サウアー, ブライアン・リー

アメリカ合衆国アラウエア州 19805, ウイルミントン, レブドス
タートコート2514